

筋萎縮性側索硬化症の病像・予後に関連する因子の探索・同定

研究分担者 熱田 直樹

名古屋大学医学部附属病院 神経内科 助教

研究要旨

多施設共同の ALS 患者経時的臨床情報収集、ゲノム遺伝子収集システムである **Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS)** に蓄積された前向き臨床情報を用いて、ALS の進行や予後を予測する臨床的因子の探索、同定を行った。2006 年 2 月から 2011 年 6 月までに登録された 520 人の ALS 患者のうち、孤発性で改訂版 **El Escorial** 診断基準で **clinically probable laboratory-supported ALS** 以上を満たす 401 人を解析対象とした。その結果、ALS 患者における頸部屈筋の筋力は、生存期間及び発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能までの期間といった機能予後を予測するための、独立した有用な指標の一つであることが示された。診療、介護体制整備のための状態予測や、臨床試験におけるデザイン策定に寄与できる。

A.研究目的・背景

多施設共同の ALS 患者経時的臨床情報収集、ゲノム遺伝子収集システムである **Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS)** は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）をベースに構築され、ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。

個別の ALS 患者の臨床経過は多彩であり、数か月の経過で死亡する患者から 10 年以上生存する患者も存在する。また、生存期間だけでなく、球症状、上肢機能、歩行機能など日常生活活動度（**activities of daily living: ADL**）に関わる機能が廃絶されるまでの期間も多彩である。経管栄養、非侵襲的陽圧換気療法、人工呼吸器導入などといった適切な医療、福祉、介護の対応をとるためには、嚥下障害や呼吸機能障害などの出現を個別に予測する必要がある。また、臨床試験にあたっては、進行抑制効果を適切にとらえるデザインを構築するために、生存

期間や運動機能が廃絶されるまでの期間を予測する因子を把握することが重要である。既報告では、生存期間に関する予後不良因子として、高齢発症、球症状で発症、診断時の呼吸機能低値、発症後短期間での診断、診断時の機能スコア低値などが示されているが、ADL の低下を予測する因子に関しては十分に検討されていない。また、筋力低下出現部位と予後との関連に関してもこれまで十分に検討されていない。

JaCALS の前向き臨床情報を用いて、筋力低下出現部位と生存期間および球症状、上肢機能、歩行機能などそれぞれの運動機能が廃絶されるまでの期間との関連を解析した。

B.研究方法

2006 年 2 月から 2011 年 6 月までに登録された 520 人の ALS 患者のうち、孤発性で改訂版 **El Escorial** 診断基準で **clinically probable laboratory-supported ALS** 以上を満たす 401 人を解析対象とした。**JaCALS** 登録後 3 ヶ月おきに臨床研究コーディネーターによる電話調

査または医師による診察を行い、ALSFRS-R および換気補助などの導入の有無、導入時期について調査した。プライマリーエンドポイントを死亡または気管切開を伴う人工呼吸器導入、ADL の指標として発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能、独立歩行不能になった時期と定義し、前向きにその時期を特定した。登録時に頸部前屈筋、両側の肩関節外転、手関節背屈、股関節屈曲、足関節背屈の 9 か所の筋力を徒手筋力検査で 6 段階の MRC スコアを用いて評価した。頸部前屈筋の筋力は臥位で評価した。解析方法は最初に Cox 比例ハザードモデルを用いて登録時の筋力とエンドポイントおよび各 ADL 指標への到達時期との関連を解析した。さらに有意であった部位の筋力について、%VC、罹病期間、ALSFRS-R、年齢など既知の予後予測因子とともに Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行い、独立した予後予測因子であるか検討した。

倫理面への配慮

研究に参加するすべての施設で倫理委員会承認を得た。研究対象者には倫理委員会にて承認された説明書・同意書を用いて十分な説明を行い、文書同意を得て参加いただいた。

C.研究結果

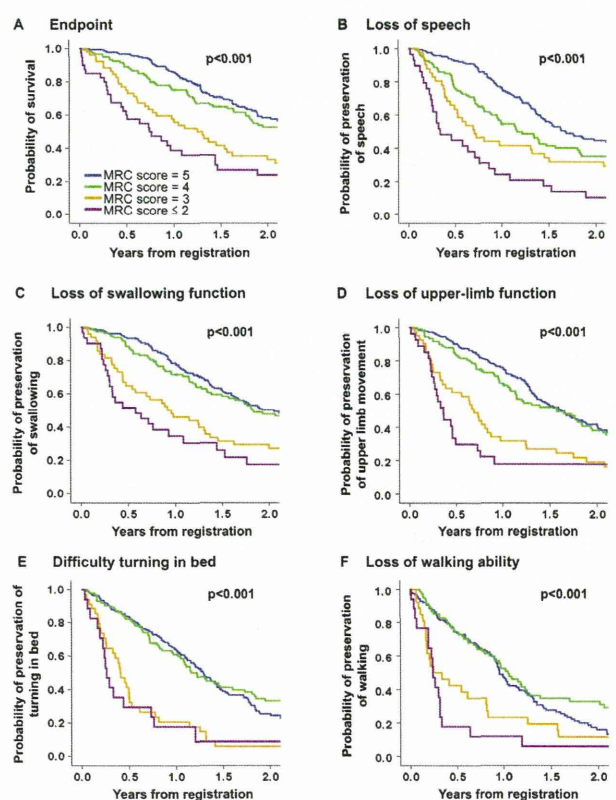
患者背景は男性 244 人、女性 157 人で、平均発症年齢は 62.2 歳、平均観察期間は 2.1 年であった。初発病変別の頻度は、上肢 47.4% (190 人)、下肢 31.4% (126 人)、構音障害 22.9% (92 人)、嚥下障害 5.5% (22 人)、頸部筋力低下 2.0% (8 人) であった。

頸部前屈筋の筋力低下は登録時からプライマリーエンドポイント (HR0.74, $p<0.001$)、発語不能 (HR0.66, $p<0.001$)、嚥下不能 (HR0.73, $p<0.001$) までの期間を最も短くする因子であった。上肢機能廃絶 (HR0.77, $p=0.001$)、寝返り不能 (HR0.77, $p=0.002$)、独立歩行不能

(HR0.80, $p=0.008$) までの期間に関しても頸部前屈筋の筋力低下は有意な因子のひとつであった。さらに頸部前屈の筋力低下は年齢、性別、罹病期間、%VC、ALSFRS-R、El Escorial 診断基準、リルゾール内服の有無、球症状の有無などといった既知の予後予測因子を共変量として Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を施行してもプライマリーエンドポイント (HR0.72, $p<0.001$) および発語不能 (HR0.78, $p=0.001$)、嚥下不能 (HR0.80, $p=0.003$)、上肢機能廃絶 (HR0.76, $p<0.001$)、寝返り不能 (HR0.83, $p=0.027$) に関して独立した予後予測因子であった。

患者を頸部前屈筋の MRC スコアで 4 群 (5、4、3、2 以下) にわけ、Kaplan-Meier 法を用いてプライマリーエンドポイントおよび各 ADL 指標に対する生存曲線を作成し log-rank test を用いて検定した。すべてのエンドポイントにおいて $p<0.001$ と有意であった。(図 1)

図 1



D. 考察

頸部前屈筋群は、主には第 2~4 頸髄によって支配される。一方で、呼吸筋は主に第 3~5 頸髄支配である横隔膜と第 1 から第 12 胸髄支配である内側肋間筋、外側肋間筋からなる。このように頸部前屈筋と呼吸筋は脊髄運動ニューロンの支配髄節が一部共通している。さらに ALS 患者において胸鎖乳突筋と横隔膜の複合活動電位が関連しているという報告があり、頸部前屈筋と横隔膜の筋力低下は関連があることを示唆している。ALS 患者の主な死因は呼吸不全であることから、頸部前屈筋の筋力低下と生存期間が関連することは妥当であると考えられる。

発語不能、嚥下不能といった球症状は延髄に存在する舌咽神経、迷走神経、副神経、舌下神経の運動ニューロンの機能不全により起きる。また、上肢の筋力は主に第 5 頸髄から第 1 胸髄の運動ニューロン支配を受ける。これらは頸部前屈筋群の支配髄節に隣接しており、障害の波及が起こりやすいと想定される。寝返りに関しては上肢機能、頸部筋力をはじめとする体幹の筋力など様々な筋力を必要とする。寝返り不能は頸髄から腰髄支配の様々な筋力低下を反映するため、頸部筋力低下とも関連すると思われる。

E. 結論

ALS 患者における頸部屈筋の筋力は、生存期間及び発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能といった機能予後を予測するための独立した有用な指標の一つであり、診療現場の判断や臨床試験のデザイン作成に寄与することができる。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*. 2014;82:705-12.

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84: 1365-71.

Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet*. 2013;93:900-5.

Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2013;5(2):221-34.

Rabkin J, Ogino M, Goetz R, McElhiney M, Marziliano A, Imai T, Atsuta N, Morita M, Tateishi T, Matsumura T, Mitsumoto H. Tracheostomy with invasive ventilation for ALS patients: neurologists' roles in the US and Japan. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013 ;14:116-23.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得 特記なし。
- 2.実用新案登録 特記なし。
- 3.その他 特記なし。

**ALS Functional Rating Scale-revised に基づく ALS 病勢進行の類型化と
類型を規定する SNP・エクソンの同定に関する統計的検討**

研究分担者 平川晃弘

名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病勢進行の程度を評価する指標として ALS Functional Rating Scale-revised（ALSFRS-R）が頻用されている。ALS は不可逆的進行性の疾患であるため、ALSFRS-R は時間経過に伴い単調減少していくことになるが、その類型の数や種類については明らかになっていない。そこで、平成 25 年度は、ALSFRS-R の経時変化の類型化と類型規定 SNP 又はエクソンの同定を実施した。その結果、ALSFRS-R の経時変化を 4 つの類型（緩徐型、シグモイド型、単調減少型、急降下型）に分類し、病勢進行が速い急降下型と関連する SNP を 7 つ同定した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病勢進行を評価する指標として ALS Functional Rating Scale-revised（ALSFRS-R）が頻用されている。ALSFRS-R は、言語・嚥下・構音・動作・歩行等の機能を定量化した病勢進行に関する総合的指標であり、最も病勢が進行した状態は 0 点（最小値）、いずれの機能にも症状がない状態であれば 48 点（最大値）となる。ALS は進行性の不可逆的疾患であるため、ALSFRS-R は時間経過に伴い単調減少することになるが、これまでの臨床経験から ALSFRS-R の経時変化（病勢進行の様相）には複数の類型が存在していることが示唆されていた。例えば、ALS の発症から数年が経過しても、ALSFRS-R を 40 点以上維持している症例や数年で 10 点以下になる症例などが確認されている。ALSFRS-R の経時変化を類型化することは、患者集団を病勢進行の様相が異なるサブタイプに分類することを意味し、将来の臨床試験や治療戦略の決定に有用である。本研究では、この複数の類型を統計学的に検出し、さらにその類型を規定している SNP を同定した。

B.研究方法

本研究で用いる前向きコホートは、Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis

research（JaCALS）と呼ばれ、2006 年 2 月に症例登録が開始された。現在、全国 30 施設において登録体制が整えられており、運営事務局は名古屋大学に設置されている。臨床調査票および血液検体は、すべて各研究参加施設内において連結可能匿名化をおこなったうえで、血液検体は DNA 抽出と細胞株化をおこない、名古屋大学内に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管されている。ALS であると本人に診断告知された症例を対象とし、改訂版 El Escorial 診断基準への適合度は臨床調査票にて確認できるようにしている。すべての登録患者から文書でのインフォームドコンセントを取得している。また、すべての参加施設で倫理委員会の承認を得ている。

2014 年 1 月末時点で、JaCALS には 905 例の症例が登録されている。本研究における解析では、当該集団から、家族歴のある症例、遺伝子異常が認められている症例、El Escorial 診断基準が suspected の症例、登録時点で人工呼吸器を導入している症例、データ欠測等により解析に不適合と判断された症例等を除外した上で実施した。また、ALSFRS-R は、3 カ月に一度、臨床研究コーディネーターから患者もしくは主介護者に対して電話インタビューにより収集される。つまり、ALSFRS-R は、登録時から 3 か月ごとに収集されている計量値の経時観察データ

となる。ただし、ALSが発症してからJaCALSに登録されるまでの数か月間は、ALSFRS-Rが不明であり、データ解析上は欠測となる。

研究目的2は、ALSFRS-Rの経時変化を類型化し、類型を規定しているSNPを同定することである。類型化に用いる統計モデルは、様々な類型を検出できるように4パラメータロジスティックモデルに基づく非線形混合分布モデルを用いた。類型の数については、統計的指標だけでなく、臨床的洞察も交えて決定した。類型とSNP又はエクソンの関連については、SNP又はエクソンごとに単変量ロジスティック回帰分析を用いてオッズ比に対するp値を推定し、高度に有意なSNP又はエクソンを探索した。また、SNP imputation を実施し、同定されたSNP又はエクソンについて更なる検討を実施した。なお、類型化の解析対象集団は465例であり、SNP又はエクソンとの関連解析は、これらが測定された459例を対象に実施した。

C.研究結果

4パラメータロジスティックモデルに基づく非線形混合分布モデルを適用し、ALSFRS-Rの経時変化を以下の4つの類型に分類した。

- ① **緩徐型**: 時間経過に伴う減少の程度が緩やかである類型
- ② **シグモイド型**: 発症から1.5年程度までは殆ど減少しないものの、その後は単調減少していく類型
- ③ **単調減少型**: 発症から一定の割合で減少していく類型
- ④ **急降下型**: 発症から2年以内にスコアが急激に減少する類型

それぞれの混合割合（推定患者割合）は、緩徐型65%、シグモイド型16%、単調減少型15%、急降下4%と推定された。次に、この4つの類型が混合している混合分布モデルを用いて、各症例がそれぞれの類型に帰属するのか、その確率を計算した（それぞれの類型に帰属する確率を合計すると1になる。）本解析では、帰属確率が最も高かった類型に帰属させることとした。その結果、緩徐型48%（221例）、シグモ

イド型15%（72例）、単調減少型24%（113例）、急降下13%（59例）となった。

次に、類型を規定しているSNP又はエクソンの同定を試みた。統計学的には、4つの類型のそれぞれを規定しているSNP又はエクソンを探索することは困難であるため、本研究では、緩徐型と急降下型を規定しているSNP又はエクソンをそれぞれ同定した。つまり、前者は、緩徐型と残り3類型のアレル頻度比較で有意になったSNP又はエクソン、後者は、急降下型と残り3類型のアレル頻度の比較で有意になったSNP又はエクソンを同定することになる。具体的には、約70万SNPと約25万エクソンを対象にアレル頻度の分布を dominant model, recessive model, additive model を用いてそれぞれ評価し、p値を算出した。その結果、いずれのモデルにおいても緩徐型を規定する高度に有意なSNP又はエクソンは同定されなかった。しかしながら、急降下型を規定するSNPは recessive model において7つ同定された ($p = 2.7 \times 10^{-8} \sim 6.4 \times 10^{-8}$)。

D.考察

ALSFRS-Rの経時変化の類型化は世界的にも初の試みであり、類型に数やタイプに関する事前情報もないため、本研究で用いた非線形混合分布モデルはヒューリスティックなアプローチであると言える。しかしながら、検出された4つの類型は臨床的にも合理性が高かった。今後は、類型の再現性を別コホートで検証することが望まれる。また、急降下型を規定しているSNPを同定することができ、現在は、更なる検討を進めている。

E.結論

本研究では、ALSFRS-Rの経時変化を4つの類型（緩徐型、シグモイド型、単調減少型、急降下型）に分類し、病勢進行が速い急降下型と関連するSNPを7つ同定した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Tanabe Y, Hashimoto K, Shimizu C, **Hirakawa A**, Harano K, Yunokawa M, Yonemori K, Katsumata N, Tamura K, Ando M, Kinoshita T, Fujiwara Y. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 2013; 18: 132-138.
2. Sato Y, Kawataki M, **Hirakawa A**, Kato T, Itani T, Hayakawa M. The diameter of the inferior vena cava provides a noninvasive way of calculating central venous pressure in neonates. *Acta Paediatrica*, 2013; e241-246.
3. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, **Hirakawa A**, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death & Disease*, 2013; e525.
4. **Hirakawa A**, Hamada C, Matsui S. A dose-finding approach based on shrunken predictive probability for combinations of two agents in phase I trials. *Statistics in Medicine* 2013; 32: 4515-4525.
5. Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka F, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, **Hirakawa A**, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase Pathogenesis of ALS. *PLoS One*, 2013; e66969.
6. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C. A stepwise variable selection for a Cox proportional hazards cure model with Application to Breast Cancer Data. *Japanese Journal of Biometrics*, 2013; 34: 21-34.
7. Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, **Hirakawa A**, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2013; 84: 1365-1371.
8. Ozeki N, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ito S, Sakao Y, Mitsudomi T, **Hirakawa A**, Yokoi K. Significance of the serum carcinoembryonic antigen level during the follow-up of patients with completely resected non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Epub ahead of print] doi: 10.1093 .
9. Goto M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama K, kamei Y, Matsukawa Y, **Hirakawa A**, Funahashi Y. Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients. *International Journal of Urology*, doi: 10.1111/iju.12266.
10. Nakamura S, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ishiguro F, **Hirakawa A**, Yokoi K. Prognostic impact of tumor size eliminating the ground glass opacity component: modified clinical T descriptors of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2013; 12: 1551-1557.
11. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C, Yonemori K, Hirata T, Shimizu C, Tamura K, Fujiwara Y. Use of Cox's cure model to establish clinical determinants of long-term disease-free survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Breast Cancer*, 2013; 3545-3579.
12. Arima H, Wakabayashi T, Nagatani T, Fujii M, **Hirakawa A**, Murase T, Yambe Y, Yamada T, Yamakawa F, Yamamori I, Yamaguchi M, Oiso Y. Adipsia increases risk of death in patients with central diabetes insipidus. *Endocrine Journal*, Epub ahead of print] doi 10.1507 .

2.学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

SNP アレイを活用した ALS の遺伝統計学的詳細解析

研究分担者 氏名 中柄 昌弘
名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であるが、孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定し病態解析を進める道筋は未確立である。本研究では、SNP アレイデータを活用し、①ALS 発症に関わるエクソン SNP の探索、②ALS の病勢進行を評価する指標である ALS Functional Rating Scale R（ALSFRS-R）の経時変化に関連する SNP 及び③ALS の発症から生存又は人工換気までの期間と関連する SNP 近傍領域の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。その結果、①については、Quality control が完了した。②、③については、ALSFRS-R および生存期間のそれぞれと関連する SNP について、近傍領域の LD ブロックを同定し、更に Imputation 法によりその領域内で複数の関連 SNP を同定した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であり、平均 3～4 年で死に至る代表的な神経難病である。治療法開発は喫緊の課題であり、病態解明、治療法開発のためには疾患関連遺伝子、分子の同定が必須である。しかし孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定し、病態解析を進める道筋は未確立である。本研究は SNP アレイデータ解析により孤発性 ALS の病態関連遺伝子を同定することを目的とする。ALS の発症に関わる遺伝子を探索するために、ケース（ALS）－コントロールの関連解析を実施する。さらに大規模前向き臨床像情報を生かして、病像・経過・予後と関連する遺伝子多型を探索同定することにより、病態解明や治療法開発の手がかりとなる遺伝子・分子の同定を行う。

B.研究方法

本研究では、Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) と呼ばれる ALS の前向きコホートを用いる。本コホートは、2006 年 2 月に症例登録が開始され、現在、全国 30 施設において登録体制が整えられており、運

営事務局は名古屋大学に設置されている。臨床調査票および血液検体は、すべて各研究参加施設内において連結可能匿名化を行ったうえで、血液検体は DNA 抽出と細胞株化をおこない、名古屋大学内に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管されている。ALS であると本人に診断告知された症例を対象とし、改訂版 El Escorial 診断基準への適合度は臨床調査票にて確認できるようにしている。すべての登録患者から書面でのインフォームドコンセントを取得している。また、すべての参加施設で倫理委員会の承認を得ている。

2014年1月末時点で、JaCALSには905例の症例が登録されている。登録症例の内、745例に対し、SNPアレイ(Illumina HumanOmniExpressExome)が測定されており、約70万のコモンSNPと約25万のエクソンSNPのジェノタイプが決定されている。

本研究における解析では、当該集団から、家族歴のある症例、遺伝子異常が認められている症例、El Escorial 診断基準がsuspected の症例、登録時点で人工呼吸器を導入している症例、データ欠測等により解析に不適合と判断された症例等を除外した上で実施した。また一部症例では、ALSの病勢進行

を評価する指標としてALS Functional Rating Scale R (ALSFRS-R) が測定された。ALSFRS-R は、言語・嚥下・構音・動作・歩行等の機能を定量化した病勢進行に関する総合的指標であり、最も病勢が進行した状態は0点（最小値）、いずれの機能にも症状がない状態であれば48点（最大値）となる。このALSFRS-R は、3 カ月に一度、臨床研究コーディネーターから患者もしくは主介護者に対して電話インタビューにより収集される。

【目的1】

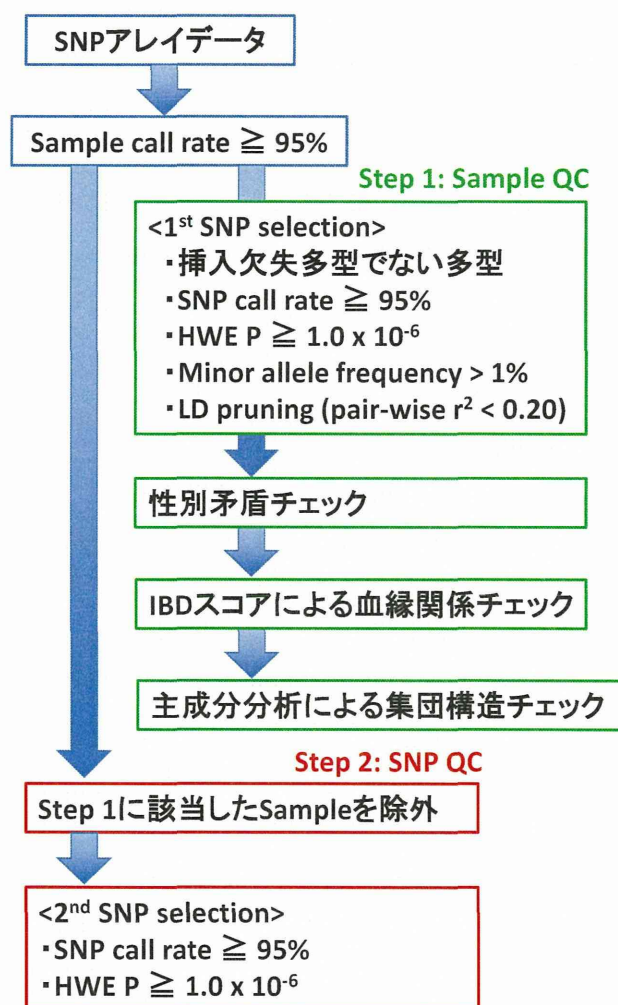
研究目的 1 は、ALS の発症に関わる遺伝子やエクソン SNP をケース (ALS) —コントロールの関連解析を用いて同定する事である。

ケース群には、JaCALS に登録され、SNP アレイが測定された 563 例を対象とした。また、コントロール群には、東京都健康長寿医療センター研究所 (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, TMIG) の協力の元、TMIG の保有する 2,360 例を使用した。これらのサンプルは、全てエクソン SNP アレイ (Illumina HumanExome) が測定されており、約 25 万のエクソン SNP のジェノタイプが決定されている。この内、ALS が未発症であると確認された 2,082 例を以降の対象とした。本研究では、これらケース・コントロール両群の SNP アレイで共通して測定されている約 25 万種類のエクソン SNP を用いて、ALS と関連するエクソン SNP を探索する事を目的とする。

本解析では、上記 SNP アレイデータの Quality Control (QC) を実施した。本 QC は右図の通り 2 段階のステップで実施した。最初のステップ 1 では、サンプルの QC を実施した。具体的には、サンプル call rate (ジェノタイプが決定された割合) が低い者を除外した後、SNP アレイデータに基づいた、SNP の性別情報と登録時の性別情報の一致性チェック、IBD スコアによる血縁関係個体のチェック、主成分分析による集団構造のチェックを実施した。ステップ 2 では、ステップ 1 のチェックで該当したサンプルを除外して、SNP 単位の QC を実施した。具体的

には、call rate が低い SNP と Hardy Weinberg 平衡 (HWE) の逸脱が疑われる SNP を除外した。ケース、コントロールで、測定している SNP アレイのプラットフォームが異なっている事から、それぞれの群で QC を行った。

ソフトウェアとして、主成分分析以外の処理を PLINK v1.07、主成分分析を EIGENSOFT version 4.2 で使用した。



図：SNP アレイデータの QC の流れ

【目的2】

研究目的 2 は、ALSFRS-R の経時変化の類型を規定しているコモン SNP やエクソン SNP を同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALS に登録され、ALSFRS-R と SNP アレイが測定された 459 例を用いて、類型と SNP の関連をロジステ

ック回帰分析で確認した結果、急降下型(発症から2年以内にスコアが急激に減少する類型)と有意な関連を示す SNP が7つ同定された。更にこれらの SNP は同一座位に存在していた(以上、平川担当分)。本解析では、これら7つの SNP 間の連鎖不平衡関係と、ハプロタイプを明らかにするため、連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析を実施した。更に、急降下型の類型と関連する SNP をより高密度に探索するため、同定された SNP を中心とした前後約 1.5Mbp の領域に対して Imputation 法を実施した。Imputation 法の reference として、1000 人ゲノムプロジェクト フェーズ III のアジア人 286 名の情報を用いた。

連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析には Haploview 4.2 を使用した。Imputation ソフトウェアには、mach 1.0.18、minimac-2013.07.17 を使用した。

【目的3】

研究目的3は、死亡又は気管切開をとまなう人工換気までの期間に関連しているコモンSNPやエクソンSNPを同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALSに登録され、SNPが測定された522例のデータ(以下、GWASデータと呼ぶ)を用いてCox回帰分析を実施した結果、有意な関連を示す座位が同定された。また、本解析にはおいては、独立した292例のALS症例(以下、Validationデータと呼ぶ)でも同系列のSNPアレイが測定済みであることから、Validationデータを用いて、GWASデータで同定された座位を検証した所、Validationデータにおいても有意な関連が2座位確認された(以上平川担当分)。本解析では、これらの座位におけるSNP間の連鎖不平衡関係を明らかにするため、連鎖不平衡解析を実施した。またSNP Imputation法を実施する事で、これらの座位の中にある関連SNPをより高密度に探索した。

連鎖不平衡解析、Imputation 法は【目的2】と同様の条件で実施した。

C.研究結果

目的1について、ケース群・コントロール群それぞれでQC作業を完了した。マイナーアレル頻度1%未満のエクソンSNPが15万種類以上確認された。現在は、両群のQCで残ったエクソンSNPについて、ケース・コントロール間の関連解析を進めている。

目的2について、ALSFRS-Rの急降下型を規定しているSNPについて、連鎖不平衡解析を実施した結果、7つのSNPが存在する周辺領域全体で連鎖不平衡ブロックを形成している事が確認できた。更にハプロタイプ解析の結果、観測された全ハプロタイプの内、これら7つのSNP全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプが約30%、全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが約60%と全体の90%以上を占めている事が確認できた。また、Imputation法により推定したジェノタイプと急降下型と関連するSNPを探索した所、recessive modelで 10^{-8} オーダーのP値を持つSNPが更に37種類確認された。現在は、Imputation法のreferenceとして1000人ゲノムプロジェクトの最新データ(SHAPEITによるタイピングデータ)を使用する事で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。目的3について、連鎖不平衡解析を実施した結果、2座位それぞれのSNPを中心としたLDブロックを特定できた。2種類のSNPアレイデータに対してImputation法により推定した結果、片方の座位において、強い連鎖不平衡にあるSNPを更に同定した。現在は、目的2と同様の方法で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。

D.考察

目的1について、エクソンSNPアレイを使用したALSの関連解析研究は、世界的にも初の試みである。今後、関連解析を進める事で、これまで報告されていないALS関連SNP又は遺伝子が同定されることが期待される。ケース・コントロール両群において、マイナーアレル頻度(MAF)が1%未満のエク

ソン SNP が非常に多く存在した。アミノ酸変異を伴う SNP の頻度は、他の領域の SNP と比べて低頻度である事、同様の傾向がエクソンアレイを使用した他の表現型に注目した研究でも報告されている事 (Atherosclerosis 2013; 229(1): 155-160) から、本データの信頼性を裏付けている。

目的 2 について、ALSFRS-R の急降下型と関連している 7 種類の SNP について、これらが同一の連鎖不平衡ブロックに存在している事が確認された。また、これら 7 つの SNP のハプロタイプは、7 つの SNP 全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプと全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが全ハプロタイプの 90%以上を占めていた。更に、Imputation 法により推定した SNP の関連解析を進めた所、同一 LD ブロック内で更に多くの SNP が同定された。これらの結果は、これら全ての SNP が急降下型へ寄与しているのではなく、この LD ブロック内に急降下型の原因となる SNP が少数存在していると考えられる。

目的 3 について、生存又は人工換気までの期間と関連している 2 か所の座位について、連鎖不平衡関係を明らかにできた。今後より最新の reference データを使用する事でより高精度な関係が明らかになると期待される。

E. 結論

本研究では、①ALS 発症関連エクソン SNP の探索のための Quality control(QC)、②ALSFRS-R の経時変化の中で発症から 2 年以内にスコアが急激に減少する類型と関連するコモン又はエクソン SNP 及び、③生存又は人工換気までの期間に影響するコモン SNP 又はエクソン SNP の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。いずれの解析においても、最新のゲノムワイド関連解析研究で使用されている遺伝統計学的解析手法を適用している事から、本解析で得られた結果の妥当性は高いと言える。今後、①については、関連解析を進めていく事で、有用なエクソン SNP が得

られることが期待される。②、③については、近年のゲノム研究の目覚ましい発展により、新しい情報が日々公開されている事を鑑み、最近公開された 1000 人ゲノムプロジェクトの最新データ (SHAPEITによるタイピングデータ)を reference とした Imputation 法の実施により、より高精度な結果が得られると期待される。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Wu Y*, Gao H*, Li H*, Tabara Y*, Nakatochi M*, Chiu YF*, Park EJ*, Wen W*, Adair LS, Borja JB, Cai Q, Chang YC, Chen P, Croteau-Chonka DC, Fogarty MP, Gan W, He CT, Hsiung CA, Hwu CM, Ichihara S, Igase M, Jo J, Kato N, Kawamoto R, Kuzawa CW, Lee JJ, Liu J, Lu L, McDade TW, Osawa H, Sheu WH, Teo Y, Vadlamudi S, Van Dam RM, Wang Y, Xiang YB, Yamamoto K, Ye X, Young TL, Zheng W, Zhu J, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. Human Molecular Genetics 2014; 23(4): 1108-1119. (*equal contributors)
2. Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, Nakatochi M, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsu F, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A, Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M. Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset

myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2013; 6(6): 569-578.

3. Lee JY, Lee BS, Shin DJ, Park KW, Shin YA, Kim KJ, Heo L, Lee JY, Kim YK, Kim YJ, Hong CB, Lee SH, Yoon D, Jung HK, Oh IY, Kim BJ, Lee J, Park SJ, Kim J, Kawk HK, Lee JE, Park HK, Lee JE, Nam HY, Park HY, Shin C, Yokota M, Asano H, **Nakatochi M**, Matsubara T, Kitajima H, Yamamoto K, Kim HL, Han BG, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Lee JY. A genome-wide association study of a coronary artery disease risk variant. *Journal of Human Genetics* 2013; 58(3): 120-126.
4. **Nakatochi M**, Katayama M, Kato R, Okochi M, Takase T, Yoshida Y, Kawase M, Honda H. Comprehensive combination analysis for screening of significant peptide epitopes using slide glass type-exclusive peptide array from milk protein. *Kagaku Kougaku Ronbunshu* 2013; 39(1): 40-45. Japanese.

2.学会発表

1. Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, **Nakatochi M**, Chiu YF, Park EJ, Vadlamudi S, Fogarty M, Wen W, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES, Asian Genetic Epidemiology Network (AGEN) Adiponectin Working Group: A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2, *American Society of Human Genetics* 2013, Boston, America, October 22-26, 2013.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得
なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
平成 25 年度（分担）研究報告書
大規模孤発性 ALS 患者前向きコホートの遺伝子・不死化細胞リソースを用いた
病態解明、治療法開発研究

大規模 ALS 患者コホートのゲノム遺伝子検体を用いた遺伝子多型解析

研究分担者 氏名 池川 志郎
所属 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム チームリーダー

研究要旨 孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因解明、画期的な治療法の創出のために、病態関連遺伝子を明らかにする。JaCALS（Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research）では、既に 700 症例以上の臨床情報並びに DNA が保存されている。これまで、本分担研究では ALS 症例の遺伝的要因を調べるために、一塩基多型（SNP）を用いたゲノム解析を行ってきた。本年度は、追加日本人 ALS 検体 340 例、対照 7,784 例を用いてゲノムワイド関連解析（GWAS）を行った。その結果、孤発性 ALS と強く関連する SNP を 33 SNPs 同定した。

A.研究目的

ALS はその 90%が孤発性であり、平均 3 年で死に至る原因不明の神経難病である。孤発性 ALS は、過去の様々な疫学研究から遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症する多因子遺伝性疾患と考えられている。これまで、JaCALS と共同で、（前向き）臨床像情報を生かした病像・経過・予後との関連解析や、病態解明の手がかりとなる遺伝子を同定するために、SNP を用いたゲノム解析を行ってきた。本年度は、日本人 340 例、対照 7,784 例について、GWAS を行った。

B.研究方法

ALS340 例、対照 7,784 例について、GWAS を行った。まず、患者全症例について家族 ALS 原因遺伝子（*SOD1*、*OPTN*等）の変異が無いことを確認した。その後、SNP タイピングを行った。対照は、日本人一般集団 7,784 例を用いた。SNP アレイは、Illumina 社製 Human OmniExpress Exome BeadChip を使用した。全例について、データの品質管理を行った（Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate 等）。

（倫理面への配慮を含む） 文部科学省、厚生労働省及び経済産業省合同「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に従い、検体収集と研究計画は、名古屋大学、理化学研究所、その他関連機関における倫理委員会の承認のもと実施した。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得したのち、収集した。

C.研究結果

孤発性 ALS と有意な相関を認める 33 SNPs を同定した。それらの SNP は、全てマイナーアレル頻度の低いものであった。また、数種の SNP は、過去の GWAS 以外の方法で見つかった ALS 関連遺伝子の遺伝子領域にマップされた。ただし、欧米人の GWAS において見出された SNP と本邦 ALS の間に関連は認められなかった。

D.考察

孤発性 ALS を対象に GWAS を行った。今回、我々は孤発性 ALS と強い関連を認める新規の SNP を見出した。ALS 臨床像との関連解析も進めていく。現在、610K SNP を用いた関連解析のデータと本研究におけるデータを統合したメタ解析を行っている。

E.結論

孤発性 ALS の易罹患性に関わる 33 SNPs と候補遺伝子領域を同定した。既報の SNP と孤発性 ALS の関連は認められなかった。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

なし。

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

大規模 ALS 患者コホートのゲノム遺伝子検体を用いた遺伝子多型解析

研究分担者 氏名 飯田 有俊
所属 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム 上級研究員

研究要旨 孤発性 ALS の発症は、遺伝的要因と環境的要因の相互作用によるものと考えられているが、その原因は現在まで殆ど何も明らかになっていない。本研究では、孤発 ALS の遺伝的要因、分子病態を解明することを目的として、一塩基多型 (SNP) を用いたゲノム解析を行っている。本年度は、新たに日本人 ALS340 例、対照 7,784 例を用いてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、孤発性 ALS と強く関連する SNP を 33 種同定した。

A.研究目的

孤発性 ALS の発症は、遺伝因子と環境因子の相互作用によるものと考えられている。しかし、その病因の多くは未だに不明であり、病態解析を進める道筋は立っていない。

これまで、主に国外の研究で孤発性 ALS 易罹患性遺伝子が単離されてきた。しかしながら、その殆どは再現性が乏しいものばかりであり、さらに *C9ORF72* をあげるまでもなく、孤発性 ALS の発症には、明らかな人種差が存在することが知られている。

一方、本邦においては、ALS の国内研究共同体である JaCALS が、孤発性 ALS 患者 700 症例以上の前向き臨床情報をデータベース化し、ALS に特化した DNA バンクで検体を収集、管理している。

本研究はこの研究リソースを基にした GWAS により ALS の病態関連遺伝子の同定を目指した。

B.研究方法

本年度は、ALS340 例について、Illumina 社製 Human OmniExprssExome BeadChip を使用して SNP タイピングを行った。ALS 全症例について家族 ALS 原因遺伝子の変異の有無をシーケンス法によって確認した。変異を有する症例は、

GWAS から除外した。対照は、日本人一般集団 7,784 例を用いた。全例について SNP タイピングを行い、データの品質管理を行った。さらに identity-by-state 法により、近親者がいないことを確認した。QQ プロット (quantile-quantile plot) を作製し、主成分分析により、集団階層化を分析した。最終的に関連値 (P 値) を用いて SNP のランキングを行ない、多重検定値による有意水準を満たす SNP を候補とした。

(倫理面への配慮を含む) 文部科学省、厚生労働省及び経済産業省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」のもとに行った。検体収集と研究計画は、名古屋大学、理化学研究所、その他関連機関における倫理委員会の承認を受け、実施した。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得したのち、収集した。

C.研究結果

33 種の SNP が孤発性 ALS と強い相関を示した。全てマイナーアレル頻度の低い SNP であった。また、数種の SNP は、これまで GWAS 以外の方法で単離された ALS 関連遺伝子の遺伝子領域にあった。欧米人において見出されていた SNP と孤発性 ALS との関連は、本研究では認められなかった。

D.考察

日本人 ALS を対象に GWAS を行った。今回、我々は孤発性 ALS と強い関連を認める新規の SNP を見出した。候補 SNP の中には、既知の ALS 関連遺伝子領域にマップされるものも含まれ、興味深い。これまで蓄積した関連解析のデータと本研究におけるデータを統合したメタ解析を行っている。

E.結論

ALS の易罹患性に関わる新規の候補遺伝子領域を同定した。欧米人で認められた既報の SNP と孤発性 ALS の関連は認められなかった。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

なし。

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

日本人 ALS における *TFG* 遺伝子変異の解析

研究分担者	氏名	中野今治	所属	東京都立神経病院
研究協力者	氏名	森田光哉	所属	自治医科大学 神経内科
	氏名	瓦井俊孝	所属	徳島大学 神経内科
	氏名	梶 龍兒	所属	徳島大学 神経内科

研究要旨

Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMNS-P)は、広範な線維束性収縮と、近位部優位の麻痺と筋萎縮、四肢末梢の感覚障害を主徴とする常染色体優性の遺伝性疾患であり、2012年に原因遺伝子 *TFG* (*TRK-fused gene*)が同定された。従来 HMNS-P と ALS の異同については議論があり、これらの病態が類似している可能性も指摘されてきた。さらに *TFG* 遺伝子が遺伝性痙性対麻痺の原因となっていることも報告されたことから、ALS での同遺伝子変異の関与を明らかとするため、日本人 ALS の遺伝子バンクである JaCALS 検体を用いて解析を行い、2 例にアミノ酸置換を伴う変異を確認した。

A.研究目的

日本人 ALS における *TFG* 遺伝子変異の関与を明らかとする。

唆されたこと、また正常対照群での同変異の欠如などから、ALS の病態に関与していることが推測された。

B.研究方法

日本人 ALS の遺伝子バンクである JaCALS より供与を受けた 592 例、および 177 例の正常対照群を対象とした。いずれの症例からも、遺伝子解析について文書で同意を得ている。

TFG 遺伝子の coding 領域の変異の有無を HRM (high resolution melting) 法でスクリーニングし、direct sequence 法にて確認を行った。

E.結論

TFG 遺伝子変異は ALS の病態に関与していることが示唆されたが、今後さらなる症例の蓄積、剖検症例での検討、さらに in vitro での解析を通じて病的意義について検討することが必要である。

C.研究結果

2 種類の遺伝子変異 c.882A>C(p.Gln294His)、c.1079G>A (p.Arg360Lys)をそれぞれ 1 例ずつに確認した。これらの遺伝子変異の有無を 177 例の正常対照群で調べたが、同変異を有する者は確認されなかった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

In preparation

2.学会発表

梶 龍兒ほか:*TFG* 変異による運動ニューロン死のメカニズム 第 54 回日本神経学会学術大会 平成 25 年 5 月 29 日-6 月 1 日 東京

D.考察

同定された 2 種類の変異について PolyPhen-2 にて解析した結果では、いずれも病的変異である可能性が示

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 勝野 雅央 (名古屋大学医学部附属病院)
 渡辺 宏久 (名古屋大学医学部附属病院)
 熱田 直樹 (名古屋大学医学部附属病院)
 平川 晃弘 (名古屋大学医学部附属病院)
 中柄 昌弘 (名古屋大学医学部附属病院)
 池川 志郎 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター)
 飯田 有俊 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター)
 中野 今治 (自治医科大学医学部)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I.	Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan.	Neurology	82	705-12	2014
Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G.	Lower Motor Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis.	JAMA Neurol.	71	172-9	2014
Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S.	ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19	Am J Hum Genet.	93	900-5	2013